

大鼠胰岛甲硫氨酸脑啡肽免疫 细胞化学的阳性显示

刘胜洪 张亦农 李肇春 刘子龙 肖道恒 王庆堂

(同济医科大学 武汉)

摘 要

本实验用免疫细胞化学 PAP 法和高度敏感的免疫金银法,对大鼠胰腺石蜡切片,用相邻切片比较法,进行免疫细胞化学反应,发现在大鼠胰岛A细胞内,呈现出甲硫氨酸脑啡肽的阳性免疫反应。根据文献报道,胰岛内分泌细胞中还有几种其它的调节肽类的物质存在,可以推测,胰岛内分泌功能受较复杂的神经体液(包括旁分泌和自分泌)调节机制的影响。文中对甲硫氨酸脑啡肽与其它神经肽类物质在胰岛A细胞中共存的意义也进行了讨论。

关键词: 胰岛A细胞, 甲硫氨酸脑啡肽, 免疫细胞化学

组织学将胰岛内分泌细胞按分泌激素种类分为A, B, D, PP等细胞,它们可分别释放胰高血糖素(GLU);胰岛素(INS);生长抑素(SOM);胰多肽(PP)等。血糖水平和植物神经则对这些内分泌细胞的功能活动进行调节。

近年来,随着免疫细胞化学的发展,先后有实验证实,胰岛内分泌细胞中,除含上述激素外,还会有 β -内啡肽(Grube等),脑啡肽(Feurle等),强啡肽(Cetin等),P物质(Rombout等),由此看来,胰岛内分泌细胞中确实存在一些与神经系统中的调节递质相同的物质。

本实验用免疫细胞化学PAP法和免疫金银法,在研究大鼠胰岛内分泌细胞构筑时,发现胰岛A细胞呈甲硫氨酸脑啡肽(M-ENK)阳性反应。对此,本文进行了分析讨论。

材 料 和 方 法

一、动物及取材:

Wistar 大白鼠 4 只,在 3%戊巴比妥麻醉下,剖腹取胰尾组织,在 Bouin 固定液中剪成小块后,固定 4 小时。继之,脱水,透明,石蜡包埋。5 μ 连续切片,分别编号粘贴在涂有铬矾明胶的载玻片上。48℃温箱放置过夜。

本文1988年9月26日收到,1989年2月8日修回。

二、试剂:

兔抗甲硫酸脑啡肽抗血清 (Anti-M-ENK) 系 Immunonuclear 公司产; 兔抗胰高血糖素抗血清 (Anti-GLU) 系 Amersham 公司产; 羊抗兔 IgG, 中国医科院基础医学研究所免疫室提供; 过氧化物酶—兔抗过氧化物酶复合体 (PAP) 由同济医大附属同济医院提供。葡萄球菌 A 蛋白 (PA), 上海生物制品所产。金标 PA 为本组 1987 年 12 月制备。M-ENK 纯抗原: Sigma 公司产。正常兔血清由本室戴晓莉老师提供。

三、免疫细胞化学 (简称 ICC) 染色反应步骤:

1. PAP 法: ①切片脱蜡至水。②3% H_2O_2 10 分钟。③含 0.2% Triton X-100 的 0.1M PBS 漂洗 10 分钟。④ 0.01M PBS 稀释的 1% 正常小牛血清封闭 10 分钟。⑤一抗孵育 (稀释度见实验分组) 4°C, 48 小时后, 室温 2 小时。⑥PBS 漂洗 5 分钟, 换 3 次, 用羊抗兔 IgG (1:40) 孵育, 32°C, 45 分钟。⑦同前 PBS 漂洗后, 入 1:40 PAP, 32°C, 45 分钟。⑧PBS 漂洗后, 入 0.05% DAB (TBS 稀释) 进行显色反应, 15—25 分钟, 阳性反应出现后, TBS 洗去 DAB。然后, 脱水, 透明, 树胶封片。

2. 免疫金银法: 步骤①②③⑤同上。④⑥用 TBS 漂洗 5 分钟, 换 3 次后, 分别用 1% 和 10% TBS 稀释的卵清蛋白封闭 10 分钟。⑦入 1:10 金标 PA (15nm), 室温 2 小时。⑧先后用 TBS 和双蒸水漂洗后, 按王保乐银加强法进行增强染色, 蒸水洗净后, 脱水, 透明, 树胶封片。

四、实验分组:

1. 实验组: A) 用 Anti-M-ENK 抗血清分四个稀释度组 (1:1000; 1:1500; 1:2000; 1:2500) 对切片进行 ICC 染色, B) 取与上述切片相邻的切片, 用 Anti-GLU 抗血清对其进行 ICC 染色。

2. 阴性对照组: 将正常兔血清分为四个稀释度组 (1:500; 1:1000; 1:1500; 1:2000) 对切片进行 ICC 染色。

3. 中和对照组: 用纯 M-ENK 抗原以每毫升 100 μ g 的 M-ENK 对上述各稀释度 Anti-M-ENK 抗血清进行中和, 过夜, 离心后取上清液对切片进行 ICC 染色。

结 果

用四种不同稀释度 Anti-M-ENK 抗血清对 4 只大鼠胰腺石蜡切片进行 ICC 染色后, 均在胰岛周边显示出数量较多, 环胰岛排列的阳性细胞, 取与之相邻的经过 Anti-GLU 抗血清处理的 ICC 染色的切片进行对比, 上述两种抗血清的反应都发生在同一种细胞——即胰岛 A 细胞内 (见图 1, 图 2)。

在 PAP 反应强度方面, 用 Anti-M-ENK 抗血清显示的切片明显较 Anti-GLU 血清显示的结果弱, 提示 A 细胞中两种物质的含量有一定差距。为了提高 Anti-M-ENK 的 ICC 染色的阳性显示效果, 我们采用了免疫金银法。与 PAP 法相比, 用该法显示的结果更为令人满意。

用四个不同稀释度的正常兔血清进行的替代一抗的对照切片上, 我们发现除 1:500 浓度组切片胰岛 A 细胞呈弱阳性反应外, 其余三组切片均呈阴性反应。这与 Grube 等报

道的现象相似。说明在进行胰岛细胞 ICC 显示时, 必须用高稀释度抗血清来回避这种假阳性反应的结果发生。



图 1—4 说明:

大鼠胰岛甲硫氨酸脑啡肽 (M-ENK) 和胰岛高血糖素 (GLU) 的免疫细胞化学染色。对相邻胰陈石蜡切片 (5 μ) 用免疫金银法显示 M-ENK (图 1), GLU (图 2); 用 PAP 法显示 M-ENK (图 3), GLU (图 4)。倍数 600 \times , 图片结果说明两种抗血清的免疫细胞化学反应在相邻切片上显示的是相同细胞, 皆属胰岛 A 细胞。

中和对照组用纯 M-ENK 对 Anti-M-ENK 抗血清进行中和后, 所进行的 ICC 染色的切片中, 胰岛 A 细胞呈阴性反应结果。说明该抗血清对 M-ENK 有高度免疫活性。

讨 论

用 Anti-M-ENK 和 Anti-GLU 两种抗血清对 4 只大鼠胰腺切片进行 ICC 染色, 两种方法 (PAP 法, 免疫金银法) 均能在胰岛 A 细胞显示 M-ENK 的阳性反应。对此, 我们认为有如下问题值得讨论。

1. 因文献提出胰岛 A 细胞具有一定的非特异性结合能力, 在使用 1:600 左右正常兔血清处理的 ICC 染色切片中会出现假阳性结果。本实验用正常兔血清替代一抗处理对照切片的结果也说明了这一点。为此, 我们采用提高一抗稀释度的办法, 来显示反应的特异性。经过使用 1:2500 稀释的 Anti-M-ENK 抗血清孵育的切片, 仍显 ICC 反应

阳性,而在1:1000以上正常兔血清处理 ICC反应切片中,假阳性反应消失,说明关于非特异性结合的问题可能被排除。

2.交叉反应问题:因有人报道,胰岛A细胞内有 β -内啡肽和强啡肽存在,而这两种肽类物质与脑啡肽都有相似之处,它们之间是否存在交叉反应问题应该予以重视。但艾民康,赵铁千等根据实验资料分析,得出结论,尽管M-ENK与 β -内啡肽的部分片段序列相同,但彼此间并不存在交叉反应,或交叉反应甚微弱。

另外,强啡肽的三种亚型虽然都具有与脑啡肽相同序列的片段,但Cetin等1983年做胰岛免疫细胞化学实验前对多种抗血清的中和试验结果表明,Anti-M-ENK抗血清不能够识别强啡肽,反之亦然。

3. Timmers等对胰岛M-ENK进行定量观察的同时,用PAP法,又在胰岛 β 细胞内观察到M-ENK的阳性反应。因此他认为胰岛中的ENK物质与胰岛素共存于 β 细胞内。

本实验用高稀释度抗血清,在4只大鼠胰腺石蜡切片上,用两种不同的免疫细胞化学方法,在胰岛A细胞内均显示出M-ENK的阳性反应。这种与Timmers等人报道的结果不同的原因,还有待于进一步探讨。

近年来,先后有文献报道,在胰岛A细胞内有 β -内啡肽,强啡肽,本实验发现大鼠胰岛A细胞内存在M-ENK的阳性免疫细胞化学反应。对这些物质共存的现象还不能很好解释。1981年,Teitelman等提出小鼠胰高血糖素细胞可能是由多巴胺能神经元转变而来,这为A细胞内神经递质的共存现象,从发生学上提供了一些可以解释的依据。

至于大鼠胰岛A细胞内M-ENK存在的功能意义,目前尚不清楚。鉴于胰岛在发生学和分泌功能上都不是一个简单的器官,其内分泌细胞之间又存在较多的缝隙连接,因此推测,A细胞内的M-ENK和其它神经肽样物质可能参与胰岛的内分泌功能的调节,而且很可能在旁分泌或自分泌调节机制中起重要作用。我们将对这一推测开展进一步实验研究。

参 考 文 献

- 艾民康等 1987 神经介质及有关酶类的组织化学。人民卫生出版社。
- Cetin, Y. 1985 Immunohistochemistry of β -endorphin in the endocrine pancreas of rat and man. *Histochemistry*. 83(4):369—373.
- Feurle, G.E. et al. 1982 Met-and Leu-enkephalin immuno- and bio-reactivity in human stomach and pancreas. *Life science*. 31:2961—2969.
- Grube, D. et al. 1978 Pancreas glucagon cells contain endorphin-like immunoreactivity. *Histochemistry*. 59:75—79.
- Rombout, J.H.M. and Reinecke, M. 1984 Immunohistochemical localization of (neuro) peptide hormones in endocrine cell and nerves of the gut of a stomachless teleost fish, *Barbus conchoni* (Cyprinidae). *Cell and Tissue Research*. 237:57—65.
- Teitelman, G. et al. 1981 Transformation of catecholaminergic precursors into glucagon (A) cell in mouse embryonic pancreas. *Proceeding of the national academy of science U.S.A.* 78(8):5225.
- Timmers, K.I. et al. 1986 Opioid peptides in rat islet of Langerhans. *Diabetes*. 35(1):52—57.

THE POSITIVE IMMUNOCYTOCHEMICAL REACTION OF MET-ENKEPHALIN IN LANGERHAN ISLET OF RAT

Liu Shenghong Zhang Yilong Li Zhaochun
Liu Zilong Xiao Daoheng Wang Qinglang
(*Tongji Medical University, Wuhan*)

Neighboring paraffin sections of pancreas of rat were performed with immunocytochemistry (PAP method and protein A gold-silver method). It was found that positive immunocytochemical reaction of Met-enkephalin and glucagon appeared in the same cells (i.e. A cell) of endocrine pancreas after a series of test for specificity of the reaction. According to some works reported previously, some other regulative neuropeptides exist in endocrine pancreas too, it could be concluded that the function of islet may be affected by a complicated neuro-humoral regulative system (including paracrine and autocrine regulation). The meaning of the coexistence of Met-enkephalin with other neuropeptides in the glucagon cell of Langerhan islet were discussed.

Key words: A cell of islet, Met-enkephalin, Immunocytochemistry